

Utilisation d'un hydrogel pour la culture de chondrocytes

L'invention concerne l'utilisation d'un hydrogel cellulosique pour la culture tridimensionnelle de chondrocytes en vue de leur implantation en un site cartilagineux.

Le cartilage est un tissu conjonctif de soutien spécialisé non vascularisé, non innervé, résistant et élastique. Il est présent au niveau des côtes, du sternum, du nez et des oreilles mais également au niveau des articulations. Le cartilage contient des cellules spécialisées appelées chondrocytes et une matrice extracellulaire (MEC) composée essentiellement de fibres de collagène et de protéoglycane.

Le cartilage articulaire peut être le siège de nombreuses altérations d'origine inflammatoire (polyarthrite rhumatoïde, ostéoarthrite), traumatologique ou liées au vieillissement (arthrose). L'établissement de ces atteintes cartilagineuses conduit, à plus ou moins long terme, à une dégradation de la matrice extracellulaire et une diminution de la cellularité. L'absence de vascularisation et de prolifération des chondrocytes confère à ce tissu de faibles capacités de réparation qui rendent ces processus cataboliques irréversibles. Au regard du vieillissement de la population, ces pathologies dégénératives concernent aujourd'hui une part importante de la population et représentent donc un enjeu majeur de santé publique. Dans ce contexte, la communauté scientifique s'intéresse depuis de nombreuses années aux moyens de régénérer un tissu cartilagineux fonctionnel.

Afin de stimuler les faibles propriétés de réparation spontanée du cartilage, des techniques chirurgicales de chondroplastie abrasive, de micro fracture ou de spongialisation ont été proposées (Hunziker, 2002). Ces techniques, permettant la formation d'un caillot sanguin d'origine sous-chondrale, conduisent à la formation d'un tissu cartilagineux qui demeure fibreux et transitoire (Shapiro et al., 1993). Parallèlement, des techniques de transplantation de tissu possédant des propriétés chondrogéniques ont également été étudiées. L'utilisation de transplants autologues de périoste ou de péricondre et de tissus ostéochondral (mosaicplastie) a permis la néoformation d'un tissu de type cartilagineux après

implantation (Hunziker, 2002). Les nombreuses limitations de ces techniques (instabilité de la greffe, calcification, faible reproductibilité des résultats cliniques) et la restriction de leur indication à la réparation de lésions focales, ont récemment conduit au développement de nouvelles techniques d'ingénierie tissulaire appliquées aux atteintes traumatologiques du cartilage.

Brittberg et al. furent les premiers à proposer une méthode de réparation basée sur la transplantation de chondrocytes autologues (Brittberg et al., 1994). Celle-ci se déroule en trois temps, tout d'abord un fragment de cartilage est prélevé dans une zone non portante afin d'isoler des chondrocytes. Ceux-ci sont alors multipliés *in vitro* en monocouche puis réimplantés sous un lambeau périosté au niveau de la lésion. Les résultats ont montré une réparation du défaut cartilagineux, mais les patients doivent subir deux interventions chirurgicales lourdes. Par ailleurs, le phénotype des cellules après leur amplification en monocouche reste à déterminer.

Plusieurs matrices tridimensionnelles d'origine végétale ou animale ont par ailleurs été développées comme les éponges de collagène, la fibrine, l'acide hyaluronique ou l'alginate (Cancedda et al., 2003). Le risque de transmission virale associé à l'utilisation de ces matériaux biologiques et les réactions inflammatoires observées lors des expérimentations pré-cliniques, ont dirigé les recherches actuelles vers le développement de biomatériaux totalement synthétiques (Hunziker, 2002). Des polymères tels que l'acide poly lactique, l'acide poly glycolique, les fibres de carbone, le polyesteruréthane, le Dacron et le Téflon ont été proposés et utilisés *in vitro* pour la culture 3D de chondrocytes ou de cellules mésenchymateuses. Parmi ces polymères synthétiques, certains ont entraîné des réactions immunitaires ou une inflammation après leur implantation en site cartilagineux (Cancedda et al., 2003).

Des compositions d'hydrogel injectables sont décrites notamment dans le brevet US 6,129,761.

Les inventeurs ont maintenant mis en évidence l'intérêt de cultiver des chondrocytes en trois dimensions au sein d'un hydrogel auto-rétriculant en fonction du pH, en vue d'une implantation dans un site cartilagineux.

L'hydrogel utilisé est un hydrogel auto-réticulant en fonction du pH, qui est constitué d'une solution aqueuse d'hydroxyéthylcellulose (HEC) ou d'hydroxypropylméthylcellulose (HPMC) sur laquelle sont greffés des groupements silanes qui permettent la formation de liaisons covalentes entre les chaînes d'HEC ou d'HPMC.

Ce type de matériau polymère est décrit en association avec une charge minérale dans la demande de brevet internationale WO 97/05911.

Ce matériau est constitué de préférence d'un polymère de formule simplifiée :

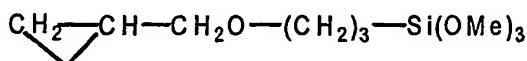
10 (HEC ou HPMC)-O-X-Si(OZ)₃

pouvant être obtenu par réaction d'hydroxyéthylcellulose (HEC) ou d'hydroxypropylméthylcellulose avec un composé de formule (1) :

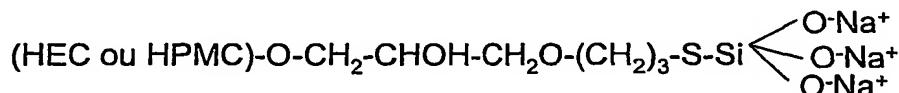


où X représente un atome d'halogène ou un groupe hydrocarboné à fonction époxy, notamment en C₂₋₂₀, et Z est choisi parmi un atome d'hydrogène, un métal alcalin et un groupe alkyle, notamment en C₁₋₅.

Le composé de formule (1) peut être par exemple le (3-glycidoxypyropyl)triméthoxysilane



En milieu basique, le composé organosilicié se greffe sur l'HEC ou l'HPMC avec ouverture de l'époxyde et les groupes méthoxysilane sont hydrolysés pour conduire à un polymère de formule simplifiée :



De préférence, le polymère est un polymère d'HPMC silanisée.

25 Ce polymère est stable en solution aqueuse à un pH supérieur ou égal à environ 12,4. Une acidification de la solution provoque une augmentation progressive de la viscosité et la formation d'un hydrogel. Ce phénomène physique correspond à la réticulation du polymère par (i) transformation des groupes silanolates en groupes silanols :



puis formation d'un réseau tridimensionnel par

(ii) condensation d'un silanol sur un autre silanol



et/ou

5 (iii) condensation d'un silanol sur un groupe hydroxy des cycles des éthers de cellulose ou des substituants



10 Cette réticulation de type covalent provoquée par une baisse du pH de la solution aqueuse du polymère est réversible et l'hydrogel se redissout lorsque l'on augmente le pH du milieu. Ainsi, avant d'être utilisé, le polymère synthétisé peut se présenter sous la forme d'une poudre qui peut être dissoute dans une solution alcaline d'hydroxyde de sodium. Le pH de gélification se situe entre 7 et
15 12 en fonction de la vitesse de réticulation recherchée.

Le gel obtenu est stérilisable à l'autoclave (par exemple à 121°C pendant 20 minutes).

20 Le polymère en solution aqueuse basique, avant réticulation, peut également être mélangé à une solution tampon physiologique avant son utilisation biologique. Le pH du mélange final est ainsi adapté au temps de manipulation recherché avant réticulation de l'ensemble. Ce temps de réticulation est mesurable par rhéométrie oscillatoire et peut varier de 5 minutes à 5 jours en fonction des paramètres de ce mélange, principalement le pH et la température (Bourges et al., 2002a ; Bourges et al., 2002b).

25 Pour fournir un taux de réticulation convenable pour l'application envisagée, il est souhaitable que les groupes latéraux porteurs de silicium, de type silanolate ou précurseur de silanolate de métal alcalin ou d'ammonium, représentent de 0,5 à 5% du poids sec total du polymère.

30 L'invention a pour objet l'utilisation d'un tel hydrogel d'HEC silanisée ou d'HPMC silanisée, auto-réticulant en fonction du pH, pour la culture tridimensionnelle *ex vivo* de chondrocytes.

L'hydrogel utilisé présente notamment les avantages suivants :

- il est biocompatible avec des cellules chondrocytaires intégrées en son sein ;
- les chondrocytes sont intégrés de manière intime dans l'hydrogel ;
- les chondrocytes dédifférenciés par amplification en monocouche se redifférencient au sein de l'hydrogel, et maintiennent des caractéristiques de chondrocytes ;
- la réticulation est contrôlable par le pH du tampon biologique ajouté au mélange d'hydrogel et de cellules chondrocytaires.

5 Les cellules mises en culture dans l'hydrogel sont de préférence des chondrocytes humains ou animaux, de préférence des chondrocytes autologues, de patients présentant une lésion du cartilage. Il peut par exemple s'agir de cellules prélevées au niveau d'un tissu cartilagineux, par exemple à partir d'une partie du cartilage articulaire ou au niveau du cartilage nasal.

10 Les cellules mises en culture dans l'hydrogel peuvent être également des cellules indifférenciées, capables de différenciation chondrogénique. Sont ainsi comprises les cellules souches mésenchymateuses ou des cellules souches provenant de tissu adipeux. Les premières peuvent être notamment obtenues par 15 prélèvement de moelle osseuse (typiquement par aspiration à l'aide d'une seringue depuis les os trabéculaires tels que os longs, crête iliaque), les secondes par lipo-aspirations (typiquement par aspiration sous vide de masses 20 graisseuses).

Ces cellules indifférenciées sont ensuite cultivées en présence de l'hydrogel dans des conditions permettant l'induction d'un phénotype chondrocytaire. Ces conditions sont de préférence une culture dans des milieux 25 de culture classiques (DMEM ou MEM), additionnés de glutamine et d'antibiotiques si nécessaires, et de sérum animal ou humain, de préférence autologue, ou substituts de sérum, ainsi que d'adjuvants chondrogéniques. On peut citer notamment insuline, transferrine, sodium sélénite, acide ascorbique, TGF-beta, IGF-1, BMP (« bone morphogenetic protein »), dexamethasone, acide 30 linoléique, BSA (« serum albumine bovine »), ou pyruvate. D'autres adjuvants pourront également être utilisés afin d'induire la différenciation chondrogénique des cellules. La culture est de préférence réalisée dans des conditions humides à 37°C en présence de concentrations en oxygène pouvant varier selon les

besoins. L'hypoxie a en effet été montrée comme un facteur important pour le développement d'un phénotype chondrocytaire.

L'invention a également pour objet un procédé *ex vivo* de préparation d'un complexe de cellules intégrées dans un hydrogel, complexe destiné à être injecté dans un site cartilagineux, ledit procédé comprenant le mélange *ex vivo* de chondrocytes ou de cellules indifférenciées, capables de différenciation chondrogénique, avec un hydrogel d'HEC ou d'HPMC silanisée, autoréticulant en fonction du pH, dans un tampon biologique au pH approprié pour la réticulation de l'hydrogel, dans des conditions et une durée appropriées pour l'intégration et la culture tridimensionnelle des chondrocytes, le cas échéant issus de la différenciation desdites cellules indifférenciées, dans l'hydrogel.

Tout tampon biologique peut être utilisé par l'homme du métier. A titre d'exemples, on peut citer le tampon phosphate (PBS, phosphate buffered salt), tampon HEPES, ou TRIS. Tout milieu biologique connu de l'homme du métier est en outre utilisable, tel que le milieu DMEM ou alpha-MEM (alpha minimum essential medium).

De manière préférée, le procédé comprend les étapes *ex vivo* suivantes :

- l'amplification de chondrocytes en monocouche, sur un support solide, tel qu'une plaque de culture ;
 - la récolte des chondrocytes amplifiés, dédifférenciés de par leur amplification en monocouche ;
 - le mélange des chondrocytes amplifiés dédifférenciés avec l'hydrogel dans un tampon biologique au pH approprié pour la réticulation de l'hydrogel, ce qui conduit à l'intégration des chondrocytes au sein de l'hydrogel et à leur redifférenciation.

Les propriétés rhéologiques de l'hydrogel composé d'HEC ou d'HPMC silanisée permettent son injection sur le lieu d'implantation, favorisant ainsi la vectorisation des chondrocytes par chirurgie peu invasive.

L'hydrogel au sein duquel les chondrocytes ont été cultivés peut être implanté dans un site de la lésion, normalement occupé par du cartilage.

Les lésions visées peuvent être des pertes de substances cartilagineuses focales liées à des séquelles traumatologiques ou, plus généralement, toutes les atteintes ou pertes cartilagineuses ostéoarticulaires ou plastiques.

L'invention peut être appliquée à l'ingénierie de l'ensemble des tissus 5 cartilagineux c'est à dire de type :

- hyalin (présent au niveau de la cloison nasale, du larynx, des anneaux trachéaux, articulaires, ou à l'extrémité sternale des côtes) ;
- fibro-cartilage (présent au niveau des disques intervertébraux, certains cartilages articulaires, et la symphyse pubienne) ;
- 10 - élastique (présent au niveau du pavillon de l'oreille, du conduit auditif externe, de l'épiglotte, de la trompe d'eustache, et des cartilages laryngés).

La réparation des disques intervertébraux est particulièrement visée. La cause des lombalgies n'est pas connue, mais pourrait être due au disque intervertébral et à sa détérioration inévitable et relative à l'âge. Le disque 15 intervertébral est une structure fibrocartilagineuse composé de quatre tissus concentriques disposés entre les corps vertébraux adjacents. La couche extérieure est l'anneau fibreux externe, qui est constitué de fibres de collagène fortement orientées. L'anneau fibreux interne est moins dense en collagène, et est moins organisé que l'anneau externe. La zone de transition est une fine zone 20 de tissu fibreux, qui sépare l'anneau intérieur du nucleus pulposus, zone centrale gélatineuse formant un noyau. Les disques intervertébraux sont hypovascularisés et possèdent une innervation limitée. Chez l'adulte, les disques sont nourris par diffusion des nutriments et des métabolites. Les disques contiennent relativement peu de cellules enchaînées dans une matrice extracellulaire abondante, 25 constituée principalement d'eau, de protéoglycans, de collagène, et de protéines non collagéniques. Les cellules du disque synthétisent ces macromolécules et maintiennent et réparent cette matrice extracellulaire. A l'âge adulte, les cellules chondrocytaires sont les seules cellules du noyau. L'anneau fibreux intérieur, la zone de transition, et le plateau cartilagineux des corps 30 vertébraux adjacents contiennent également ces chondrocytes, tandis que l'anneau externe contient une majorité de cellules de type fibroblastique. Un certain degré de dégénérescence du disque se produit chez tous les individus. Une association claire a été montrée entre l'âge et la dégénérescence des

disques. La dégénérescence a été observée dès la seconde décennie de la vie. Les personnes qui présentent des disques symptomatiques subissent une accélération du processus normal de vieillissement, en raison de facteurs acquis mais également génétiques.

5

L'invention a donc également pour objet un procédé du traitement du corps humain ou animal, comprenant l'administration par injection d'hydrogel tel que défini plus haut préalablement colonisé *ex vivo* par des chondrocytes, par exemple selon le procédé décrit plus haut.

10 L'injection peut être réalisée à l'aide d'un système comportant une seringue stérilisable et des embouts munis de pistons à usage unique, par exemple le système commercialisé par HAWE NEOS DENTAL, comprenant une seringue stérilisée à l'autoclave (réf. N° 440, Seringue Hawe-Centrix C-R^R, Mark III) et des embouts (réf. N° 445).

15

Les figures et exemples suivants illustrent l'invention sans en limiter la portée.

LEGENDE DES FIGURES :

20 Les Figures 1A à 1C représentent l'activité MTS des chondrocytes cultivés pendant 24, 48 et 72 heures soit dans les conditions contrôles (absence d'hydrogel), soit au contact de l'hydrogel si-HPMC, soit en présence d'actinomycine D (5 µg/ml). SW1353 (Fig. 1A), C28/12 (Fig. 1B) et chondrocytes nasaux humains (Fig. 1C). *p<0,001 comparé au contrôle à chaque temps.

25 Les Figures 2A à 2C représentent le dénombrement des chondrocytes cultivés pendant 24, 48 et 72 heures soit dans les conditions contrôles (absence d'hydrogel), soit au contact de l'hydrogel si-HPMC, soit en présence d'actinomycine D (5 µg/ml). SW1353 (Fig. 2A), C28/12 (Fig. 2B) et chondrocytes nasaux humains (Fig. 2C). *p<0,001 comparé au contrôle à chaque temps.

30

EXEMPLES :

Exemple 1 : préparation de l'hydrogel

Matériels :

5

- HPMC E4M® (Colorcon- Dow Chemical, France)
- Glycidoxypolytriméthoxysilane (GPTMS) (Acros, Belgique)
- HEPES (Sigma-Aldrich, St Louis, USA)
- NaOH (VWR International, Fontenay-sous-Bois, France)
- NaCl (VWR International)
- HCl 0.1 M (Sigma Aldrich).
- Sérum de veau fœtal (SVF) (Dominique Dutscher, Brumath, France).

a) Synthèse de la poudre d'hydroxypropyl méthylcellulose silanisée (Si-10 HPMC)

Les synthèses sont réalisées sur des quantités de 240 grammes d'HPMC. Le polysaccharide sélectionné est l'E4M®. La synthèse est réalisée avec du glycidoxypropyltriméthoxysilane (GPTMS) dans un ballon de 6 litres en milieu hétérogène dans un solvant organique (Bourges et al., 2002). La synthèse est effectuée sous ébullition pendant 3 heures. La poudre d'HPMC silanisée est séchée une première fois à l'étuve pendant une nuit puis lyophilisée (Christ Alpha 1-4 ST).

b) Préparation de la solution d'hydroxypropyl méthylcellulose silanisée

20 Six grammes de poudre de Si-HPMC sont solubilisés dans 200 ml d'une solution de NaOH à 0.2 M. Ce mélange est agité pendant 48 heures. La solution de Si-HPMC est ensuite dialysée pendant 16h dans une solution de NaOH 0.09 M. Puis une deuxième dialyse est réalisée dans une solution de NaOH 0.09 M pendant 2 heures. Cette solution de Si-HPMC à 3% est ensuite aliquotée et 25 stérilisée à la vapeur (121°C, 30 minutes).

c) Induction de la réticulation de l'hydrogel

L'hydrogel utilisé pour la culture cellulaire est préparé extemporanément en mélangeant, sous hotte à flux laminaire, 7.5 ml de solution de Si-HPMC avec 7.5 ml de tampon HEPES et supplémenté de 10% de SVF. Le tampon HEPES 30 est préparé par dissolution de 3.1 g d'HEPES et 0.8g de NaCl dans une solution

10

d'HCl à 0.03M. Cette solution est ensuite aliquotée et stérilisée à la vapeur (121°C, 30 minutes).

Ce mélange HEPES/Si-HPMC est agité au Vortex 15 secondes puis centrifugé 2 minutes à 1200 rotations par minutes (rpm). Ce mélange est 5 transféré en plaque de culture. Le milieu de culture est ajouté 1 heure après.

d) Caractérisation physique de l'hydrogel par Rhéologie

Matériels et méthodes

Afin de caractériser la réticulation de l'hydrogel, les inventeurs ont effectué la mesure de deux paramètres rhéologiques: le module dispersif G'' 10 (caractéristique des liquides) et le module conservatif G' (caractéristique des solides). Cette mesure est réalisée avec un rhéomètre (Rhéostress 300, Thermo Haake, Karlsruhe, Germany) équipé d'un cône plan de 60 mm de diamètre et de 1° d'angle (Cône plan C60/1 titan, Thermo Haake). L'entrefer entre la troncature et le plateau est de 0.053 mm. La mesure est réalisée en mode oscillatoire avec 15 trois fréquences d'oscillations (1 Hz, 3.2 Hz et 10 Hz) et une contrainte imposée de 1 Pascal, à une température de 37°C et pendant 1 200 000 secondes (13.8jours). Les résultats sont exprimés en Pa.

Résultats

20 L'hydrogel présente les caractéristiques d'un liquide visqueux au moment de sa préparation. Lors de sa réticulation, ses caractéristiques physiques évoluent vers celles d'un gel. L'hydrogel préparé selon le mode de réalisation préféré, présenté à l'exemple 1, se compose, une fois la réticulation terminée (10 jours), de 1,5 % de polymère sec et de 98,5 % d'eau, une teneur en eau 25 comparable à celle du cartilage. La taille calculée de la maille de l'hydrogel (0,22 µm) apparaît inférieure à la taille d'une cellule.

Dans le but de connaître les caractéristiques physiques de l'hydrogel, comme le point de gel qui correspond au début de la réticulation, le temps de réticulation et la taille de la maille de l'hydrogel, l'évolution en fonction du temps 30 de la composante liquide (G'') et de la composante élastique (G') a été mesurée, et ce, pour trois fréquences différentes. Donc à chaque fréquence correspond un couple G'/G'' . La $\text{Tan}\Delta$ de chaque couple a été tracée, ces trois courbes se

11

rejoignent en un point : le point de gel. La réticulation de l'hydrogel a débuté 33 minutes après sa préparation, et s'est achevée 244 heures plus tard (10 jours) moment où la composante élastique (G') atteint un plateau pour une valeur de 310 Pa. Cette valeur de la composante élastique nous a permis de calculer la taille de la maille de l'hydrogel.

$$\xi = \left(\frac{KT}{G'} \right)^{\frac{1}{3}} = \left(\frac{1.38 \times 10^{-23} \times 300}{310} \right)^{\frac{1}{3}} = \left(\frac{4.14 \times 10^{-21}}{310} \right) = 23.7 \text{ nanomètres}$$

Dans les conditions de préparation décrites ci-dessus, la taille statistique moyenne de la maille de l'hydrogel (\bar{x}_i) était de 0,023 µm.

10 Tableau 1 : Résultats de la caractérisation rhéologique de l'Hydrogel de Si-HPMC à 3%

Vol de solution de Si-HPMC	Vol Tampon	% Si-HPMC	% final de Si-HPMC	pH mélange	G'	KT/G'	$\bar{x}_i (\xi)$ en micromètre	Point de gel en minutes
1	1	3,00%	1,50%	7,37	310	1,3355E-23	0,023	33

15 **Exemple 2 : Test de cytotoxicité de l'hydrogel**

MATERIELS ET METHODES

2.1 Culture cellulaire

a) Lignées chondrocytaires

Matériels:

20 - Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) (Invitrogen corporation, Paisley, UK).

- Milieu nutritif Ham's F12 (Invitrogen corporation).

- Pénicilline/streptomycine (Invitrogen corporation)

- L-glutamine (Invitrogen corporation)

12

- Trypsine/EDTA (Invitrogen corporation).

Les inventeurs ont utilisé les lignées de chondrocytes humains SW1353 et C28/I2 respectivement dérivées d'un chondrosarcome humain (Mengshol et al., 5 2000) et de cartilage costal humain immortalisé par l'antigène T du virus simien 40 (Goldring et al., 1994). Ces cellules sont cultivées dans un mélange volume/volume de DMEM et Ham's F12 supplémenté avec 10% de SVF, 1% de pénicilline/streptomycine et 1% de L-Glutamine (DMEM/F12 complet) dans une atmosphère humide à 37°C et 5 % CO₂.

10 Le milieu de culture est renouvelé entièrement tous les deux jours. Lorsque les cellules atteignent 80-90 % de la confluence, elles sont traitées par 2 ml de Trypsine (0.025%) /EDTA (0.01 %). Après incubation 3 minutes à 37°C, la solution de trypsine/EDTA est collectée et centrifugée (8 min, 1200 rpm) en présence de 8 ml de milieux DMEM/F12 complet. Après élimination du 15 surnageant, le culot cellulaire est reconstitué avec 10 ml de DMEM/F12 complet. Les cellules sont ensuite dénombrées et réparties dans des flacons de 25 cm² à une densité de 10 000 cellules/cm².

b) Chondrocytes primaires

20 - Isolement de chondrocytes nasaux humains

Matériels:

- Hank's balanced salt (HBSS, Invitrogen Corporation).
- Protéase (Pronase, Sigma-Aldrich).
- Collagénase type IV (Sigma-Aldrich).

25 Du cartilage nasal humain est prélevé après obtention du consentement éclairé de patients subissant une rhinoplastie reconstructrice. Le cartilage nasal est lavé cinq fois dans du Hank's Balanced Salts (HBSS) et découpé en copeaux sous hotte à flux laminaire. Les copeaux de cartilage sont ensuite incubés pendant 30 minutes à 37°C dans du HBSS contenant 1mg/ml de protéase. Les 30 copeaux sont ensuite rincés trois fois dans du HBSS, puis incubés pendant 4 heures et sous agitation dans du DMEM complet (10 % SVF, 1% Pénicilline/Streptomycine et 1% L-Glutamine) contenant 0.625 mg/ml de

13

collagénase. Le surnageant est centrifugé 5 minutes à 1400 rpm. Le culot est lavé une fois dans du HBSS, centrifugé (8 min, 1200 rpm) et resuspendu dans 10 ml de DMEM complet. Les cellules sont dénombrées et transférées en flacon de 25 cm² à une densité cellulaire de 10 000 cellules/cm². Les cellules sont 5 maintenues en culture en atmosphère humide à 37°C et 5 % CO₂. Les milieux de culture sont renouvelés tous les deux jours. Lorsque les cellules atteignent 80-90 % de la confluence, elles sont traitées à la trypsine/EDTA comme décrit ci-dessus.

10 - Isolement de chondrocytes articulaires de lapin

Matériels:

- Hyaluronidase (Sigma-Aldrich).
- Trypsine (Sigma-Aldrich).
- collagénase type II de *Clostridium histolyticum* (290 U/mg, Sigma-15 Aldrich)
- Tamis cellulaire (Falcon, Franklin Lakes, USA).

Comme précédemment décrit par Ghayor et al., 2000, des lapins nouveaux-nés âgés de 12 ou 13 jours sont sacrifiés par dislocation cervicale après anesthésie. Sous hotte à flux laminaire, les pattes avant et arrière sont prélevées et 20 débarrassées de leurs tissus mous. Les articulations des genoux et des épaules sont ensuite disloquées. A l'aide d'un scalpel, le cartilage articulaire est découpé en fines tranches et les copeaux obtenus sont placés dans du HBSS. Ces copeaux sont successivement incubés 10 minutes à 37°C dans 12 ml de HBSS contenant 0.05% de hyaluronidase, puis 15 minutes à 37°C dans 6 ml d'HBSS 25 contenant 0.2% de trypsine. Après deux rinçages dans du HBSS, les copeaux sont transférés dans du HBSS à 0.2% de collagénase et incubés 30 minutes à 37°C.

Les copeaux subissent une dernière étape de digestion par incubation dans une solution de DMEM complet enrichi de 0.03% de collagénase pendant 30 15 heures. Le produit de digestion est filtré sur tamis cellulaire, collecté et centrifugé (8 min, 1200 rpm). Le culot cellulaire est resuspendu dans 20 ml de DMEM complet. Les cellules sont dénombrées et transférées en flacon de 25 cm²

à une densité cellulaire de 10 000 cellules/cm². Les cellules sont finalement maintenues en culture en atmosphère humide à 37°C et 5 % CO₂. Les milieux de culture sont renouvelés tous les deux jours. Lorsque les cellules atteignent 80-90 % de la confluence, elles sont traitées à la trypsine/EDTA comme décrit ci-dessus.

2.2. Etude de la cytotoxicité de l'hydrogel

a) Conditions expérimentales

Matériels:

10 - Plaque de culture 24 trous Corning-Costar (Corning BV, Schiphol-Rijk, The Netherlands).

15 - Actinomycine D (Sigma-Aldrich)

- DMSO (Sigma-Aldrich)

- Méthyle Tetrazolium Salt (MTS) (Cell Titer 96 MTS, Promega corporation, Madison, WI).

- Phényle Méthyle Sulfoxyde (PMS) (Sigma-Aldrich).

- Phosphate buffered salt (PBS, Invitrogen corporation)

Afin de déterminer la cytotoxicité de l'hydrogel, les chondrocytes primaires humains, les cellules SW1353 et C28/I2, sont répartis dans des plaques de culture 24 trous à une densité de 10 000 cellules par cm². Après 24 heures d'incubation à 37°C et 5% CO₂, les cellules sont cultivées en présence (500 µl de Si HPMC par trou) ou en absence d'hydrogel (500 µl de milieu complet) pendant 24, 48, et 72 heures. Des cellules cultivées en absence d'hydrogel sont également traitées par de l'Actinomycine D (5 µg/ml) ou son excipient (DMSO) pour disposer d'un contrôle positif de cytotoxicité.

b) Test MTS

Ce test colorimétrique mesure la capacité des mitochondries des cellules vivantes à oxyder le sel de tétrazolium MTS en formazan. Le produit coloré formé est proportionnel à l'activité déshydrogénase des mitochondries. La mesure de l'absorbance permet donc de quantifier la viabilité cellulaire. Après 24, 48, et 72 heures d'incubation dans les conditions décrites ci-dessus, les cellules sont

15

lavées avec du milieu complet et incubées 1 heure à 37°C en présence de 100 µl de réactif MTS contenant 48µg/ml de PMS et 2mg/ml de MTS. La mesure d'absorbance à 490 nm est réalisée par un lecteur de microplaques (MRX, Dynatech Laboratories, VWR international). Les résultats sont exprimés en pourcentage d'activité MTS par rapport aux conditions contrôles (cellules cultivées en absence d'hydrogel).

c) Dénombrement cellulaire

Après 24, 48 et 72 heures d'incubation dans les conditions précisées ci-dessus, le milieu de culture avec ou sans hydrogel est aspiré et remplacé par 200 µl de trypsine/EDTA. Les cellules sont incubées 2 minutes en atmosphère humide à 37°C et 5 % CO₂. Les cellules sont ensuite collectées et centrifugées (8 min, 1200 rpm) en présence de 2 ml de milieu de culture complet. Le culot est resuspendu dans 2 ml de milieu de culture complet et les cellules sont dénombrées après coloration vitale par une solution de Bleu Trypan (0.04% dans PBS) sur cellule de Malassez. Les résultats sont exprimés en nombre total de cellules par puits.

RESULTATS

2.3 Caractérisation des Chondrocytes nasaux humains

20

Afin de caractériser le phénotype des cellules isolées de cartilage nasal humain, les inventeurs ont étudié par RT-PCR l'expression de certains marqueurs du phénotype chondrocytaire après isolation et au cours d'une culture en monocouche. Cette étude montre que les chondrocytes nasaux fraîchement isolés (P0) exprimaient le collagène II, l'Aggrécane, et le collagène X mais également le collagène I. Lors des différents passages, les inventeurs ont observé une modification de l'expression de ces différents gènes. L'expression du collagène de type II a diminué entre P0 et P3. L'aggrécane a présenté une baisse de son expression entre P0 et P1. Le collagène X était faiblement exprimé par les chondrocytes fraîchement isolés, son expression n'était plus détectable à P3. En revanche, l'expression du collagène de type I a augmenté fortement entre P2 et P3.

16

Ces résultats montrent que les chondrocytes nasaux fraîchement isolés exprimaient le collagène II, l'agrégane et le collagène X. L'expression de ces marqueurs chondrocytaires a diminué en culture monocouche et s'est accompagnée d'une forte augmentation de l'expression du collagène de type 1.

5

2.4 Cytotoxicité de l'hydrogel

a) Mesure de l'activité MTS des chondrocytes cultivés au contact du gel :

Pour déterminer l'effet cytotoxique de l'hydrogel sur les chondrocytes, les inventeurs ont réalisé un dosage de l'activité MTS sur les lignées cellulaires SW1353 et C28/I2 et sur les chondrocytes humains nasaux après 24h, 48h et 72 heures de culture au contact de l'hydrogel Si-HPMC.

Les résultats ont montré que l'activité MTS n'était pas modifiée par la présence de l'hydrogel. En effet, il n'a pas été observé de différence significative, pour les chondrocytes SW1353, C28/I2 et les chondrocytes nasaux humains, entre les conditions de cultures contrôles et les cultures réalisées au contact de l'hydrogel. En revanche, l'actinomycine-D, inhibiteur de la transcription, utilisée ici comme contrôle positif de la cytotoxicité a entraîné une diminution significative de l'activité MTS dès 24 heures. L'activité MTS des chondrocytes SW1353, C28/I2 et isolés du cartilage nasal humain après 24 heures en présence d'actinomycine D a diminué respectivement de 72%, 69% et 86% (figures 1A à 1C).

Ces résultats montrent que l'hydrogel n'a pas affecté l'activité MTS ni des chondrocytes SW1353 et C28/I2, ni des chondrocytes nasaux humains.

25 b) Dénombrement au bleu trypan:

Afin de déterminer l'influence de l'hydrogel sur la prolifération cellulaire, les inventeurs ont réalisé un dénombrement cellulaire à l'aide d'une coloration au bleu trypan. Cette coloration permet de distinguer les cellules vivantes (blanches) des cellules mortes (bleues). Ce dénombrement est effectué après 24h, 48h et 72 heures de culture au contact de l'hydrogel pour les lignées cellulaires SW1353 et C28/I2 et pour les chondrocytes nasaux humains (figures 2a à 2C).

17

Il n'a pas été observé de différence significative entre le nombre de chondrocytes SW1353, C28/I2 et chondrocytes nasaux humains cultivés dans les conditions contrôles et lors d'une culture réalisée au contact de l'hydrogel de Si-HPMC. En revanche, l'actinomycine-D a entraîné une diminution significative du 5 nombre de cellules dès 24 heures. Le nombre de chondrocytes SW1353 a diminué de 88%, le nombre de chondrocytes C28/I2 a diminué de 81% après 24 heures d'incubation avec l'actinomycine D. Les chondrocytes nasaux humains ont enregistré une diminution de 43% après 24h de traitement par l'actinomycine D.

10 Ces résultats montrent que l'hydrogel n'a pas entraîné de modification de la prolifération que ce soit pour les chondrocytes SW1353, les chondrocytes C28/I2 ou les chondrocytes nasaux humains.

15

Exemple 3 : Culture des chondrocytes dans l'hydrogel

3.1 Observation des chondrocytes en culture tridimensionnelle

MATERIELS ET METHODES

20 **Conditions expérimentales**

Matériels:

- Cell tracker green (CTG) (Molecular probes, Leiden, The Netherlands).
- Ethidium Homodimer-1 (EthD-1) (Molecular probes) .

25 Les chondrocytes articulaires de lapins, les cellules SW1353 et les C28/I2, sont mis en suspension dans l'hydrogel à raison de 1 million de cellules/ml d'hydrogel. 500 µl de ce mélange sont déposés dans des puits de plaques de culture 24 puits. Les cellules sont ensuite cultivées en présence de milieu complet pendant 48h, 96 h, 1 semaine et deux semaines. Parallèlement, un 30 contrôle positif de mort cellulaire est réalisé par addition d'une solution d'actinomycine D à 5µg/ml. Les cellules cultivées au sein de l'hydrogel sont

observées grâce au cell tracker green (CTG) et ethidium homodimer 1 (EthD-1). Le CTG est un produit incolore qui diffuse librement au travers des membranes cellulaires. Il est ensuite transformé dans le cytoplasme par la glutathione S-transferase en un produit fluorescent incapable de ressortir de la cellule. Le CTG 5 produit une fluorescence verte dans les cellules vivantes. L'EthD-1 est un agent intercalant de l'ADN dont la fluorescence augmente de 40 fois après fixation sur les acides nucléiques. Il ne pénètre que dans les cellules présentant des dommages membranaires. L'emploi conjoint de ces deux colorants permet une colocalisation des cellules vivantes (coloration verte) et des cellules mortes 10 (coloration rouge) (Magne et al., 2003). Le milieu de culture est aspiré et remplacé par 400 µl d'une solution de CTG à 5 µM dans du milieu de culture complet. Les cellules sont ensuite incubées 1h à 37°C. La solution de CTG est ensuite remplacée par du milieu complet et les cellules sont à nouveau incubées 15 30 minutes à 37°C. Après un rinçage au PBS, les cellules sont traitées 1h à température ambiante et à l'abri de la lumière par 400 µl d'une solution d'EthD-1 à 1µM dans du milieu complet sans SVF. Le milieu est finalement enlevé, l'hydrogel est aspiré et monté entre lame et lamelle. Les images sont obtenues 20 par microscopie épifluorescente (Axioplan, Zeiss, Iena, Germany) et sont enregistrées à l'aide d'une caméra numérique DC30 (Kappa opto-electronics GmbH, Gleichen, Germany).

Les cellules dans le gel ont également été visualisées par microscopie confocale inversée à balayage laser (IFR 26, Caroline Vignes-Colombeix) après 24, 48 et 72 h de culture comme détaillé ci-dessus. Le microscope confocal crée une image nette en éliminant les signaux n'appartenant pas au plan focal. Ce 25 microscope possède une platine porte-objet pouvant se déplacer dans l'axe Z, ce qui permet de faire varier le plan focal et ainsi de visualiser différents plans de l'échantillon. La fluorescence du CTG a été repérée en utilisant le détecteur de la fluorescéine isothiocyanate (FITC: $\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em collectée}} = 490-560 \text{ nm}$). La fluorescence de EthD-1 est visualisée par le détecteur de la rhodamine 30 (TRITC: $\lambda_{\text{ex}} = 568 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em collectée}} = 570-700 \text{ nm}$).

RESULTATS

19

Dans le but d'observer le développement des chondrocytes lors d'une culture tridimensionnelle au sein de l'hydrogel, les inventeurs ont effectué des colorations (CTG et EthD-1) sur les chondrocytes SW1353, C28/I2 et sur des chondrocytes articulaires de lapin. Ils ont ensuite observé les chondrocytes en 5 microscopie à fluorescence. Au sein de l'hydrogel, les chondrocytes SW1353, les C28/I2 ou les chondrocytes articulaires de lapin ont présenté une forme arrondie et étaient fortement colorés en vert par le cell tracker green. De rares cellules apparaissaient colorées en rouge. Les chondrocytes SW1353, C28I2 et articulaires de lapins se sont développés en trois dimensions dans l'hydrogel en 10 formant des nodules dont le nombre et la taille augmentaient en fonction du temps de culture.

Afin de proposer une observation tridimensionnelle des cellules cultivées dans l'hydrogel, ils ont complété leurs observations par de la microscopie confocale. Seules les observations des cellules C28I2 sont reportées dans ce 15 travail. La microscopie confocale a montré les mêmes résultats que ceux obtenus précédemment en microscopie fluorescente classique. Les cellules se développent sous forme de nodules. Les cellules traitées à l'actinomycine D pendant 48h ont présenté une forte coloration rouge. De rares cellules conservaient une coloration verte. Ces résultats indiquent que dans nos 20 conditions de culture, la double coloration cell tracker green/ethydium homodimer-1 a permis de différencier les cellules vivantes des cellules mortes. Les observations des chondrocytes SW1353, des chondrocytes nasaux humains et des chondrocytes articulaires de lapin sont en cours d'analyse.

L'ensemble de ces résultats montrent que les chondrocytes SW1353, 25 C28/I2 et les chondrocytes articulaires de lapin ont conservé leur viabilité en culture tridimensionnelle au sein de l'hydrogel.

3.2 Analyse du phénotype chondrocytaire

30 Afin d'analyser le phénotype chondrocytaire, l'expression des messagers codant pour certains marqueurs des chondrocytes a été recherchée par RT-PCR.

a) Conditions expérimentales

Matériels :

- Trizol® reagent (Invitrogen Corporation).

Afin de caractériser le phénotype des cellules isolées du cartilage nasal humain, une fraction des cellules fraîchement isolées est congelée en présence de Trizol® (passage 0; P0). L'autre fraction cellulaire est répartie à raison de 10 000 cellules/cm² dans des flacons de 25 cm². Les cellules sont repiquées toutes les semaines dans les conditions décrites précédemment (chapitre a)). Après 1, 2 et 3 passages, les cellules sont congelées à -80°C en présence de Trizol® (Passage 1 (P1), 2 (P2), et 3 (P3)).

Les chondrocytes fraîchement isolés de cartilage articulaire de lapins sont répartis à raison de 1 million de cellules/ml d'hydrogel et 2ml de ce mélange sont déposés dans des puits de plaque de culture 6 puits. Les cellules sont ensuite cultivées pendant 3 semaines avant congélation en présence de Trizol® .

15

b) Extractions des ARN totaux

Matériels :

- Chloroforme (VWR).
- Isopropanol (Sigma Aldrich).
- Ethanol (VWR).
- Agarose (Promega Corporation)
- bromure d'ethidium (BET) (Promega corporation)
- Tris Borate EDTA (TBE) (Invitrogen corporation)

Les cellules sont décongelées sur de la glace, grattées puis la solution de Trizol® est collectée et centrifugée pendant 10 minutes à 12 000 rpm et à 4°C. La phase supérieure est prélevée et additionnée de 200 µl de chloroforme puis vortexée 15 secondes. Après 10 minutes d'incubation à température ambiante, les échantillons sont centrifugés 15 minutes à 12 000 rpm et à 4°C. La phase aqueuse est prélevée et les ARNs totaux sont précipités par centrifugation (12000 rpm, 15 minutes, 4°C) en présence de 500 µl d'isopropanol. Le surnageant est prélevé et le culot est lavé avec de l'éthanol 75 % puis séché. Les ARNs totaux sont repris dans 20 µl d'eau. La quantité d'ARNs isolée est ensuite

21

évaluée par mesure de l'absorbance à 260 nm. Les concentrations d'ARNs sont finalement ajustées à 1 µg/µl. Afin de vérifier l'intégrité des ARNs extraits, 500 ng d'ARNs totaux sont séparés par électrophorèse sur gel d'Agarose à 1% dans du tampon TBE contenant du BET. La migration s'effectue à 100V pendant 30 minutes. Les ARNs totaux sont visualisés à l'aide d'un transilluminateur UV.

5 c) Analyse des transcripts par RT-PCR

- Traitement à la DNAase

Matériels :

- Désoxyribonucléase I (DNAse I) 5U/µl (Invitrogen Corporation)
- 10 - Tampon de DNAse I 10X (Invitrogen Corporation)
- Acide Ethylène diamine tétra acétique (EDTA) 25 mM (Invitrogen Corporation).

Deux µg d'ARN sont prélevés et additionnés d'1 µl de tampon de DNAse I 10X, 1 µl de DNAse I (5U/µl) et le volume est ajusté à 10µl avec de l'eau stérile. 15 Les échantillons sont ensuite incubés 15 minutes à température ambiante. La réaction est arrêtée par l'addition de 1µl d'EDTA 25 mM et le produit de la réaction est placé 10 minutes à 65°C.

- Transcription inverse (RT)

20 Matériels:

- Désoxynucleotide triphosphate (dNTP) 10 mM (Invitrogen Corporation).
- Amorces hexanucléotidiques à 0.5µg/µl (Random Hexamers, Promega Corporation hexaprimmer C1181).
- 25 - Avian Myeloblastosis virus reverse transcriptase (AMV-RT) 10U/µl (Promega Corporation).
- Tampon AMV-RT 5X (Promega corporation)
- RNase inhibitor (RNAsine) 400U/µl (Promega Corporation).

A chaque échantillon préalablement traité à la DNAase, sont ajoutés 3µl de dNTP à 10 mM, 3µl d'amorces hexanucléotidiques, 6µl de tampon AMV-RT , 1µl d'AMV-RT, 1µl de RNAsine et le volume est ajusté à 30 µl avec de l'eau

22

stérile. La transcription inverse est réalisée à l'aide d'un thermocycleur (Eppendorf Mastercycler,VWR) dans les conditions suivantes : 10 minutes à 25°C, 50 minutes à 42°C et 10 minutes à 95°C.La solution d'ADN complémentaire simple brin (ADNc) ainsi obtenue est ensuite stockée à -20°C 5 jusqu'à son utilisation pour la réaction de PCR.

- Réaction de polymérase en chaîne (PCR)

Matériels :

- Amorces oligomériques spécifiques (MWG Biotech, Courtaboeuf, France).
- 10 - Tampon Taq polymérase 10X (Invitrogen Corporation).
- Taq polymérase 5U/μl (Invitrogen Corporation).
- MgCl₂ 50 mM (Invitrogen Corporation).

La PCR est réalisée à partir de 2 μl de solution de cDNA auxquels sont ajoutés 0,5 μl d'amorce sens et 0,5 μl d'amorces antisens à 100ng/μl, 5 μl de tampon de taq polymérase, 1.5 μl de MgCl₂ , 0,5 μl de taq polymerase et 40 μl d'eau. Les réactions de PCR sont réalisées à l'aide d'un thermocycleur (eppendorf Mastercycler) dans les conditions suivantes : 3 minutes de dénaturation à 94°C suivi de 30 cycles de 20 secondes à 94°C (dénaturation), 20 secondes à 60°C (hybridation) et 20 secondes d'elongation à 72°C. La réaction 15 de PCR est achevée par 10 minutes d'elongation à 72°C. Les résultats de cette étude présentent des produits de PCR obtenus dans la phase exponentielle 20 d'amplification. La séquence des amorces, les températures d'hybridation et la taille des amplicons sont précisées dans le tableau 2 ci dessous.

25 Tableau 2 : Séquence des amorces, température d'hybridation et taille des amplicons pour les gènes référencés.

Gènes	Séquences des amorces Sens (S) et anti-sens (AS)	Tm	Taille amplicons
actine humaine	S 5'-TCTCCATGTCGTCCCAGTTG-3' AS 5'-AGTCTTCCCCCTCCATCGTTG-3'	60°C	164 pb
Collagène II (alpha 1) humain	S 5'-GGCAATAGCAGGTTCACGTACA-3' AS 5'-GAGGCGTGAGGTCTCTGTGA-3'	60°C	108 pb

et lapin			
Aggrécane humain et lapin	S 5'-CCCTGGCAATGATGGCACTGTTC-3' AS 5'-TGGCAATGATGGCACTGTTC-3'	60°C	117 pb
Collagène I (alpha 2) humain	S 5'-CATGGAAACCGTGGTCAAAC-3' AS 5'-ACCAGCGATAACCAGGCAGAC-3'	60°C	186 pb
Collagène X humain et lapin	S 5'-CAAGGCACCATCTCCAGGAA-3' AS 5'-GCATTGGTATCGTTAGCGT-3'	60°C	131 pb
Collagène I (alpha 1) lapin	S 5'-GATGCGTTCCAGTCGAGTA-3' AS 5'- GGTCTTCCGGTGGTCTTGTA-3'	55°C	312 pb

d) Séparation sur gel d'agarose

La séparation électrophorétique des produits d'amplification PCR a été réalisée sur gel d'agarose à 2% dans du tampon Tris Borate EDTA (TEB) 1X. Les 5 bandes sont révélées par du bromure d'éthidium à l'aide d'un trans-illuminateur UV. La taille des amplicons est référencée dans le tableau 2.

d) Analyse densitométrique semi-quantitative des gels d'agarose.

L'intensité des bandes obtenues sur les gels d'agarose à 2% (gènes d'intérêts et gène de référence) a été estimée à l'aide du logiciel Leica Q500 10 (Leica Imagine Systems, Cambridge, UK) permettant l'analyse semi-quantitative par densitométrie des transcrits amplifiés aux différentes conditions expérimentales. Les résultats sont exprimés comme le ratio gène d'intérêt/gène de référence en unité arbitraire.

15

RESULTATS

Afin de vérifier le maintien du phénotype des chondrocytes articulaires de lapin en culture tridimensionnelle au sein de l'hydrogel, ils ont évalué par RT-PCR l'expression des transcrits codant pour le collagène de type II, l'aggrécane et le collagène X. Parallèlement, l'expression du collagène de type I a également 20 été recherchée.

Lors d'une culture en monocouche, les inventeurs ont observé une diminution de l'expression du collagène de type II, de l'aggrécane et du collagène de type X. A près trois semaines de culture le collagène de type II demeurait

faiblement exprimé, alors que le collagène de type X et l'agrécane n'étaient plus détectables. Parallèlement, nos résultats montrent que l'expression du collagène de type I est augmentée après trois semaines de culture en monocouche.

A l'inverse, lorsque les cellules sont cultivées en trois dimensions dans l'hydrogel pendant trois semaines, l'expression du collagène de type II, de l'agrécane et du collagène de type X sont maintenues. L'expression du collagène de type I n'est pas apparue stimulée.

Ces résultats indiquent que la culture tridimensionnelle des chondrocytes articulaires de lapin permet le maintien de l'expression des marqueurs chondrocytaires (collagène II, agrécane et collagène X).

Exemple 4 : étude de la redifférenciation des chondrocytes en culture tridimensionnelle

Dans le but d'étudier la redifférenciation des chondrocytes en culture tridimensionnelle dans l'hydrogel préparé à l'exemple 1, des chondrocytes nasaux humains et articulaire de lapin fraîchement isolés ont été cultivés en monocouche pendant 4 semaines, puis en trois dimensions dans l'hydrogel et parallèlement en monocouche pendant 4 semaines.

Les ARN totaux ont été extrait à chaque passage lors des cultures en monocouche et à 2, 3 et 4 semaines pour les cultures tridimensionnelles. L'expression du collagène de type II et l'agrécane marqueurs spécifiques du phénotype chondrocytaire, mais aussi le collagène de type I marqueurs de la dédifférenciation des chondrocytes ont été recherchés par RT-PCR.

Les résultats montrent que les chondrocytes fraîchement isolés expriment le collagène de type II, le collagène de type I et l'agrécane. L'expression de ces marqueurs est modifiée lors de la culture en monocouche, l'expression du collagène II et de l'agrécane diminue lors des différents passages jusqu'à disparaître au bout de trois passages, alors que l'expression du collagène de type I augmente fortement dès le premier passage et reste fortement exprimé lors des différents passages. Les chondrocytes semblent donc s'être dédifférenciés au bout de trois passages en culture monocouche. Ensuite, lors de la culture tridimensionnelle de ces chondrocytes dans l'hydrogel, les

25

résultats ont montré une augmentation de l'expression du collagène de type II ainsi que de l'agrécanne mais également une diminution de l'expression du collagène de type I. Ces résultats suggèrent que les cellules ont retrouvé un phénotype chondrocytaire dans l'hydrogel.

5 Ces résultats indiquent que l'hydrogel utilisé permet la redifférenciation de chondrocytes préalablement dédifférenciés.

Tests statistiques

Toutes les expériences ont été réalisées en triple. Chaque expérience a
10 été réalisée deux fois. Les résultats sont exprimés comme la moyenne +/- l'écart type. Les études comparatives de moyennes ont été effectuées en utilisant le test Anova. Les résultats sont considérés comme significativement différents pour p<0,05.

15

Exemple 5 : implantation sous-cutanée de chondrocytes nasaux

Des hydrogels ont été préparés comme décrit aux exemples précédents, intégrant des chondrocytes humains dérivés de cartilage nasal (CNH). Ils ont
20 ensuite été implantés en site sous-cutané chez la souris nude, et laissés pendant trois semaines.

Les expériences ont été menées dans les cinq conditions suivantes :

- 1) chondrocytes nasaux humains cultivés en trois dimensions dans l'hydrogel pendant 15 jours avant implantation.
- 25 2) chondrocytes nasaux humains cultivés 15 jours en monocouche avant implantation via l'hydrogel.
- 3) chondrocytes nasaux humains fraîchement isolés et implantés via l'hydrogel.
- 4) fibroblastes de prépuce humain cultivés 15 jours en monocouche
30 avant implantation via l'hydrogel.
- 5) hydrogel seul.

26

Lors de la récupération des implants, les inventeurs ont pu constater que trois semaines après implantation, les implants étaient toujours bien visibles. L'hydrogel ne s'est donc pas résorbé durant ces trois semaines. Les analyses histologiques ont montré la présence de nodules de chondrocytes positifs pour la 5 coloration bleu Alcian au sein de l'hydrogel, ceci pour les trois conditions contenant des CNH (conditions 1, 2 et 3). L'ensemble de ces résultats nous a donc montré que l'hydrogel de Si-HPMC permettait la néoformation d'un tissu de type cartilagineux après trois semaines *in vivo*.

BIBLIOGRAPHIE

5 - Bourges et al., 2002a, General properties of silated hydroxyethylcellulose for potential biomedical applications, *Biopolymers* **63**(4):232-8

10 - Bourges X, Weiss P, Daculsi G, Legeay G, 2002b Synthesis and general properties of silated-hydroxypropyl methylcellulose in prospect of biomedical use. *Adv Colloid Interface Sci* **99**(3):215-28

15 - Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L 1994 Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med* **331**(14):889-95

20 - Cancedda R, Dozin B, Giannoni P, Quarto R 2003 Tissue engineering and cell therapy of cartilage and bone. *Matrix Biol* **22**(1):81-91

25 - Ghayor C, Herrouin JF, Chadjichristos C, Ala-Kokko L, Takigawa M, Pujol JP, Galera P 2000 Regulation of human COL2A1 gene expression in chondrocytes. Identification of C-Krox-responsive elements and modulation by phenotype alteration. *J Biol Chem* **275**(35):27421-38

30 - Goldring MB, Birkhead JR, Suen LF, Yamin R, Mizuno S, Glowacki J, Arbiser JL, Apperley JF 1994 Interleukin-1 beta-modulated gene expression in immortalized human chondrocytes. *J Clin Invest* **94**(6):2307-16

25 - Hunziker EB 2002 Articular cartilage repair: basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects. *Osteoarthritis Cartilage* **10**(6):432-63

30 - Magne D, Bluteau G, Faucheu C, Palmer G, Vignes-Colombeix C, Pilet P, Rouillon T, Caverzasio J, Weiss P, Daculsi G, Guicheux J 2003 Phosphate is a specific signal for ATDC5 chondrocyte maturation and apoptosis-associated mineralization : possible implication of apoptosis in the regulation of endochondral ossification. *J Bone Miner Res* **18**(8):1430-42

- Mengshol JA, Vincenti MP, Coon CI, Barchowsky A, Brinckerhoff CE 2000 Interleukin-1 induction of collagenase 3 (matrix metalloproteinase 13) gene expression in chondrocytes requires p38, c-Jun N-terminal kinase, and nuclear

28

factor kappaB: differential regulation of collagenase 1 and collagenase 3. Arthritis Rheum 43(4):801-11

- Shapiro F, Koide S, Glimcher MJ 1993 Cell origin and differentiation in the repair of full-thickness defects of articular cartilage. J Bone Joint Surg Am 75(4):532-53

5

REVENDICATIONS

1. Utilisation d'un hydrogel d'hydroxyéthylcellulose (HEC) silanisée ou
 5 d'hydroxypropylméthylcellulose (HPMC) silanisée, auto-réticulant en fonction du pH, pour la culture tridimensionnelle *ex vivo* de chondrocytes.

2. Utilisation selon la revendication 1, dans laquelle l'hydrogel est susceptible d'être obtenu par réaction d'HEC ou d'HPMC avec un composé de
 10 formule (1) :



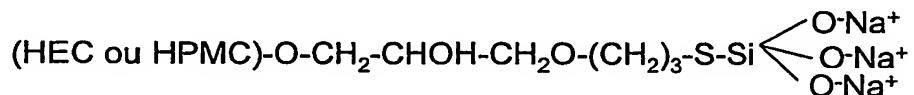
où X représente un atome d'halogène ou un groupe hydrocarboné à fonction époxy, notamment en C₂₋₂₀, et Z est choisi parmi un atome d'hydrogène, un métal alcalin et un groupe alkyle, notamment en C₁₋₅.

15

3. Utilisation selon l'une des revendications 1 ou 2, dans laquelle l'HEC ou l'HPMC porte des groupes latéraux silanolate ou précurseurs de silanolate de métal alcalin ou d'ammonium représentant de 0,5 à 5% du poids sec total de l'HEC ou l'HPMC.

20

4. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 3, l'hydrogel étant constitué d'un polymère de formule simplifiée :



5. Procédé *ex vivo* de préparation d'un complexe de cellules intégrées dans un hydrogel, complexe destiné à être injecté dans un site cartilagineux, ledit procédé comprenant le mélange *ex vivo* de chondrocytes avec un hydrogel d'hydroxyéthylcellulose (HEC) silanisée ou d'hydroxypropylméthylcellulose (HPMC) silanisée, autoréticulant en fonction du pH, dans un tampon biologique au pH approprié pour la réticulation de l'hydrogel, dans des conditions et une durée appropriées pour l'intégration et la culture tridimensionnelle des chondrocytes dans l'hydrogel.

6. Procédé *ex vivo* de préparation d'un complexe de cellules intégrées dans un hydrogel, complexe destiné à être injecté dans un site cartilagineux, ledit procédé comprenant le mélange *ex vivo* de cellules indifférenciées capables de 5 différenciation chondrogénique avec un hydrogel d'hydroxyéthylcellulose (HEC) silanisée ou d'hydroxypropylméthylcellulose (HPMC) silanisée, autoréticulant en fonction du pH, dans un tampon biologique au pH approprié pour la réticulation de l'hydrogel, dans des conditions et une durée appropriées pour l'intégration et la culture tridimensionnelle des chondrocytes issus de la différenciation desdites 10 cellules indifférenciées, dans l'hydrogel.

7. Procédé selon la revendication 5, comprenant les étapes *ex vivo* suivantes :

- 15 - l'amplification de chondrocytes en monocouche, sur un support solide ;
- la récolte des chondrocytes amplifiés, dédifférenciés de par leur amplification en monocouche ;
- le mélange des chondrocytes amplifiés dédifférenciés avec l'hydrogel dans un tampon biologique au pH approprié pour la réticulation de l'hydrogel, ce qui 20 conduit à l'intégration des chondrocytes au sein de l'hydrogel et à leur redifférenciation.

8. Procédé selon l'une des revendications 5 à 7, dans lequel l'hydrogel est susceptible d'être obtenu par réaction d'HEC ou d'HPMC avec un composé de 25 formule (1) :



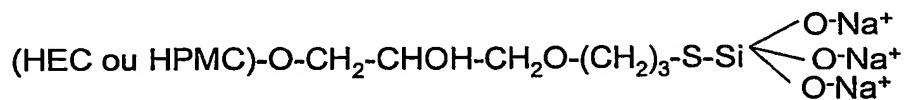
où X représente un atome d'halogène ou un groupe hydrocarboné à fonction époxy, notamment en C₂₋₂₀, et Z est choisi parmi un atome d'hydrogène, un métal alcalin et un groupe alkyle, notamment en C₁₋₅.

9. Procédé selon l'une des revendications 5 à 8, dans lequel l'HEC ou l'HPMC porte des groupes latéraux silanolate ou précurseurs de silanolate de

31

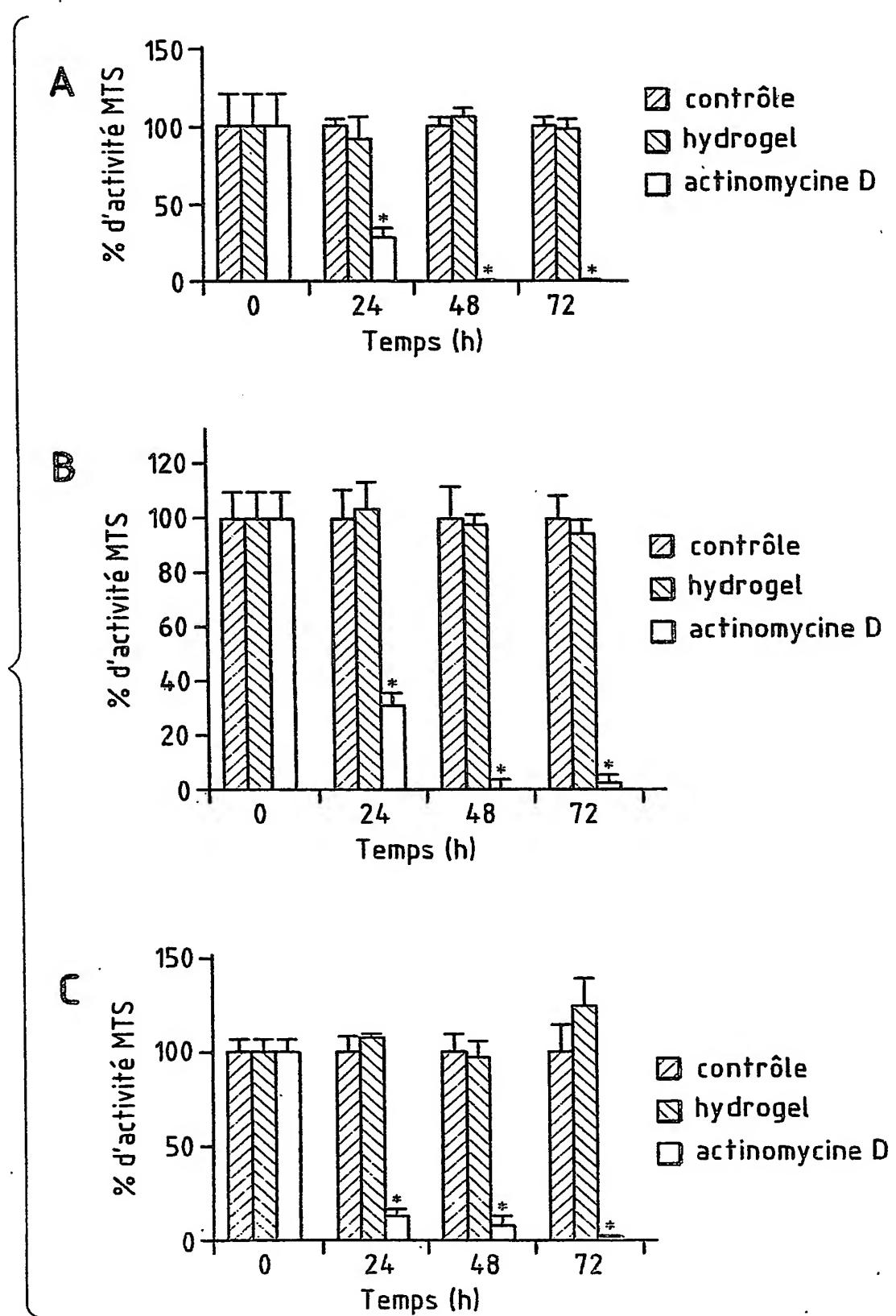
métal alcalin ou d'ammonium représentant de 0,5 à 5% du poids sec total de l'HEC ou l'HPMC.

10. Procédé selon l'une des revendications 5 à 9, l'hydrogel étant constitué
5 d'un polymère de formule simplifiée :



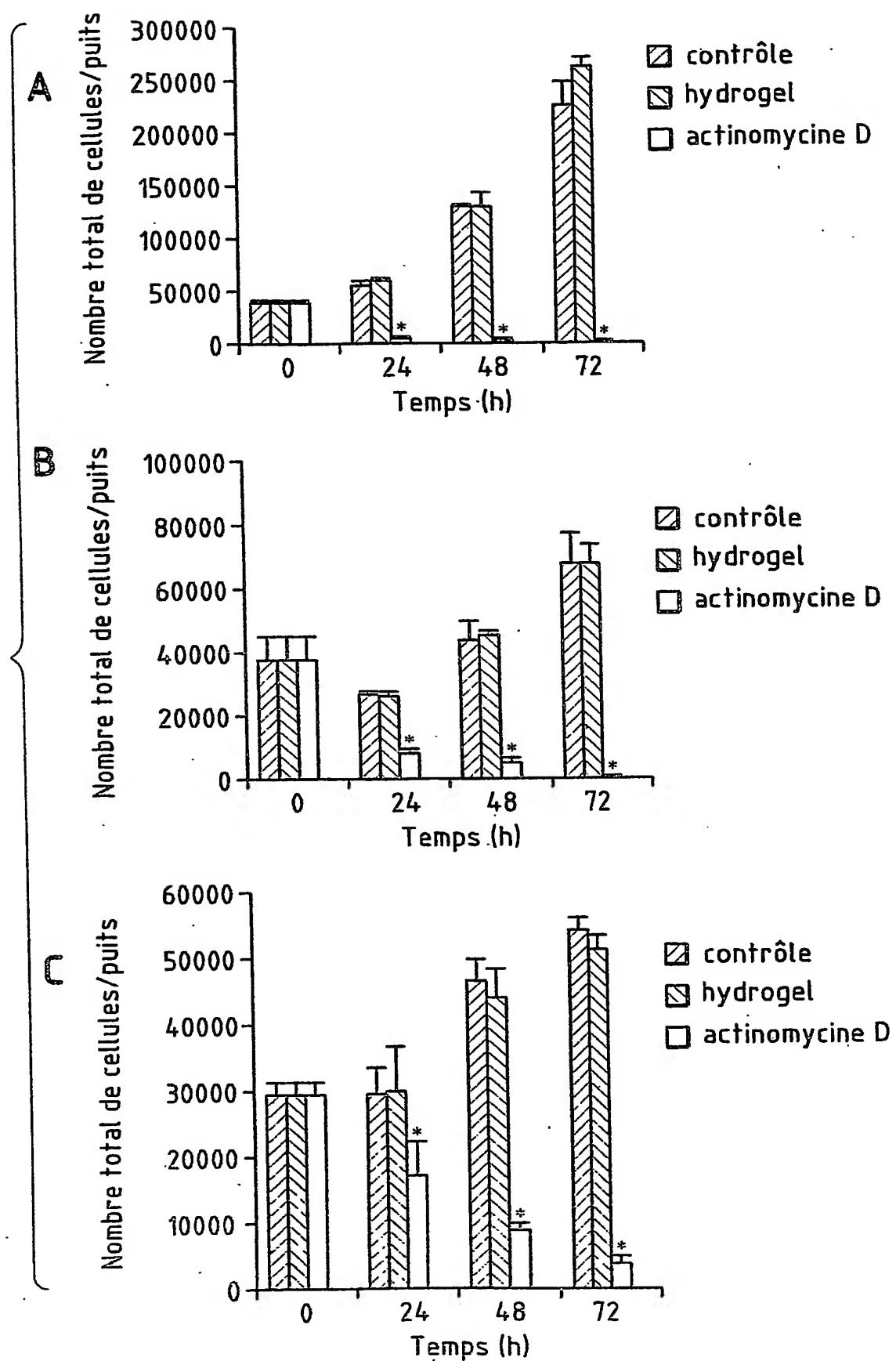
1/2

FIG. 1



2/2

FIG.2



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR2004/002844

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 IPC 7 A61L27/46 A61L27/50

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
 IPC 7 A61L

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, EMBASE, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 97/05911 A (DACULSI GUY ; DUPRAZ ANNE (FR); WEISS PIERRE (FR); CENTRE NAT RECH) 20 February 1997 (1997-02-20) cited in the application the whole document	1-10
A	US 6 129 761 A (HUBBELL JEFFREY A) 10 October 2000 (2000-10-10) cited in the application the whole document	1-10

 Further documents are listed in the continuation of box C. Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the International filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

17 March 2005

Date of mailing of the international search report

05/04/2005

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Trifilieff-Riolo, S

BEST AVAILABLE COPY

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR2004/002844

Patent document cited in search report	Publication date		Patent family member(s)	Publication date
WO 9705911	A 20-02-1997	FR	2737663 A1	14-02-1997
		AT	214292 T	15-03-2002
		AU	707039 B2	01-07-1999
		AU	6704296 A	05-03-1997
		CA	2226304 A1	20-02-1997
		DE	69619830 D1	18-04-2002
		DE	69619830 T2	12-09-2002
		DK	843562 T3	21-05-2002
		EP	0843562 A1	27-05-1998
		ES	2173306 T3	16-10-2002
		WO	9705911 A1	20-02-1997
		JP	11510076 T	07-09-1999
		JP	3597541 B2	08-12-2004
		NO	980504 A	06-04-1998
		PT	843562 T	30-08-2002
		US	6001394 A	14-12-1999
		ZA	9606635 A	05-02-1998
US 6129761	A 10-10-2000	AU	720569 B2	08-06-2000
		AU	6048596 A	30-12-1996
		CA	2223932 A1	19-12-1996
		EP	0835143 A1	15-04-1998
		JP	11505734 T	25-05-1999
		WO	9640304 A1	19-12-1996

BEST AVAILABLE COPY

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No

PCT/FR2004/002844

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 7 A61L27/46 A61L27/50

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 A61L

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, EMBASE, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	WO 97/05911 A (DACULSI GUY ; DUPRAZ ANNE (FR); WEISS PIERRE (FR); CENTRE NAT RECH) 20 février 1997 (1997-02-20) cité dans la demande le document en entier	1-10
A	US 6 129 761 A (HUBBELL JEFFREY A) 10 octobre 2000 (2000-10-10) cité dans la demande le document en entier	1-10

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- "&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

17 mars 2005

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

05/04/2005

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Trifilieff-Riolo, S

DESI AVAILABLE COPY

DESI AVAILABLE COPY

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande Internationale No

PCT/FR2004/002844

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9705911	A 20-02-1997	FR 2737663 A1 AT 214292 T AU 707039 B2 AU 6704296 A CA 2226304 A1 DE 69619830 D1 DE 69619830 T2 DK 843562 T3 EP 0843562 A1 ES 2173306 T3 WO 9705911 A1 JP 11510076 T JP 3597541 B2 NO 980504 A PT 843562 T US 6001394 A ZA 9606635 A	14-02-1997 15-03-2002 01-07-1999 05-03-1997 20-02-1997 18-04-2002 12-09-2002 21-05-2002 27-05-1998 16-10-2002 20-02-1997 07-09-1999 08-12-2004 06-04-1998 30-08-2002 14-12-1999 05-02-1998
US 6129761	A 10-10-2000	AU 720569 B2 AU 6048596 A CA 2223932 A1 EP 0835143 A1 JP 11505734 T WO 9640304 A1	08-06-2000 30-12-1996 19-12-1996 15-04-1998 25-05-1999 19-12-1996